

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 1 部門第 1 区分

【発行日】令和 3 年 9 月 16 日 (2021.9.16)

【公表番号】特表 2020-530988 (P2020-530988A)

【公表日】令和 2 年 11 月 5 日 (2020.11.5)

【年通号数】公開・登録公報 2020-045

【出願番号】特願 2020-503775 (P2020-503775)

【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/6876 (2018.01)

C 1 2 Q 1/6806 (2018.01)

C 1 2 Q 1/6869 (2018.01)

C 1 2 N 15/11 (2006.01)

【F I】

C 1 2 Q 1/6876 Z

C 1 2 Q 1/6806 Z N A Z

C 1 2 Q 1/6869 Z

C 1 2 N 15/11 Z

【手続補正書】

【提出日】令和 3 年 8 月 4 日 (2021.8.4)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

核酸リンカーを介して 2 つ以上の発光標識に接続されたヌクレオチドを含む標識ヌクレオチドにおいて、各発光標識は、任意の他の発光標識から少なくとも 5 オングストローム離れている、標識ヌクレオチド。

【請求項 2】

各発光標識が、任意の他の発光標識の重心から少なくとも 5 オングストローム離れた重心を含む、請求項 1 に記載の標識ヌクレオチド。

【請求項 3】

1 つ以上の発光標識が、前記発光標識と前記リンカー上の付着部位との間に少なくとも 8 つの隣接原子を含むスペーサ分子を介して前記リンカーに付着しており、任意で、前記スペーサ分子が、前記発光標識と前記リンカー上の前記付着部位との間に 50 個未満、40 個未満、30 個未満、または 20 個未満の連続した原子を含む、請求項 1 または請求項 2 に記載の標識ヌクレオチド。

【請求項 4】

前記リンカーが、少なくとも 10 個のモノマー単位を含むオリゴマーであり、任意で、前記オリゴマーが、150 未満、100 未満、または 50 未満のモノマー単位を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の標識ヌクレオチド。

【請求項 5】

1 つ以上の発光標識が、任意の他の付着部位から少なくとも 5 モノマー単位離れた付着部位で前記リンカーに付着している、請求項 4 に記載の標識ヌクレオチド。

【請求項 6】

前記核酸リンカーは、第 1 のオリゴヌクレオチド鎖の 2 つ以上の付着部位で 2 つ以上の発光標識に付着した同第 1 のオリゴヌクレオチド鎖を含み、かつ各発光標識は、任意の他の

発光標識の中心点から少なくとも5オングストローム離れた中心点を有する立体体積を含む、請求項1に記載の標識ヌクレオチド。

【請求項7】

前記第1のオリゴヌクレオチド鎖とハイブリダイズした第2のオリゴヌクレオチド鎖をさらに含み、

(i) 前記第1のオリゴヌクレオチド鎖が前記ヌクレオチドに付着しているか、あるいは

(ii) 前記第2のオリゴヌクレオチド鎖が前記ヌクレオチドに付着している、請求項6に記載の標識ヌクレオチド。

【請求項8】

前記2つ以上の付着部位が、前記第1のオリゴヌクレオチド鎖上において少なくとも5塩基、かつ50未満の塩基によって互いに分離している、請求項6または請求項7に記載の標識ヌクレオチド。

【請求項9】

各付着部位が、前記第1のオリゴヌクレオチド鎖上のグアニンまたはシトシンから分離された少なくとも2塩基である、請求項6～8のいずれか一項に記載の標識ヌクレオチド。

【請求項10】

少なくとも1つの付着部位が、前記第1のオリゴヌクレオチド鎖上の脱塩基部位に生じる、請求項6～9のいずれか一項に記載の標識ヌクレオチド。

【請求項11】

前記第1のオリゴヌクレオチド鎖が1つ以上のステムループを形成し、任意で、各ステムループのループ領域が、前記2つ以上の付着部位の付着部位を含む、請求項6～10のいずれか一項に記載の標識ヌクレオチド。

【請求項12】

リンカーを介して2つ以上の発光標識に接続されたヌクレオチドを含む標識ヌクレオチドであって、前記リンカーは、

第1のオリゴヌクレオチド鎖であって、共有結合カップリング化合物を介して同第1のオリゴヌクレオチドの末端で2つ以上の分岐オリゴヌクレオチド鎖に付着し、各分岐オリゴヌクレオチド鎖は発光標識を有する第1のオリゴヌクレオチド鎖と、

ヌクレオチドに付着した第2のオリゴヌクレオチド鎖であって、前記第1のオリゴヌクレオチド鎖とハイブリダイズする第2のオリゴヌクレオチド鎖と、

を含む核酸である、標識ヌクレオチド。

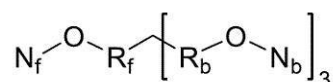
【請求項13】

各分岐オリゴヌクレオチド鎖が相補的分岐オリゴヌクレオチド鎖とさらにハイブリダイズする、請求項12に記載の標識ヌクレオチド。

【請求項14】

前記共有結合カップリング化合物が構造：

【化1】



からなり、

式中、

$N_f$  は第1のオリゴヌクレオチド鎖であり、

$N_b$  は分岐オリゴヌクレオチド鎖であり、

$R_f$  および  $R_b$  はそれぞれ、互いに独立して、置換または非置換アルキレン；置換または非置換アルケニレン；置換または非置換アルキニレン；置換または非置換ヘテロアルキ

レン；置換または非置換ヘテロアルケニレン；置換または非置換ヘテロアルキニレン；置換または非置換ヘテロシクリレン；置換または非置換カルボシクリレン；置換または非置換アリーレン；置換または非置換ヘテロアリーレン；およびそれらの組み合わせ、からなる群から選択される結合部または連結基であり、かつ

〇の各例は、隣接するオリゴヌクレオチド鎖の5'リン酸基または3'ヒドロキシル基のいずれかの酸素原子である、

請求項12または請求項13に記載の標識ヌクレオチド。

**【請求項15】**

リンカーを介して2つ以上の発光標識に接続されたヌクレオチドを含む標識ヌクレオチドであって、前記リンカーは、

共有結合カップリング化合物から伸びる3つ以上のオリゴヌクレオチド鎖を含む第1のオリゴヌクレオチド成分であって、オリゴヌクレオチド鎖の少なくとも1つが前記ヌクレオチドに付着している、第1のオリゴヌクレオチド成分と、

発光標識に付着した少なくとも1つのオリゴヌクレオチド鎖を含む第2のオリゴヌクレオチド成分であって、同第2のオリゴヌクレオチド成分が前記第1のオリゴヌクレオチド成分とハイブリダイズし、それにより前記ヌクレオチドおよび前記発光標識を接続する、第2のオリゴヌクレオチド成分と、

を含む核酸である、標識ヌクレオチド。

**【請求項16】**

リンカーを介して2つ以上の発光標識に接続されたヌクレオチドを含む標識ヌクレオチドにおいて、各発光標識は、任意の他の発光標識から少なくとも5オングストローム離れている、標識ヌクレオチド。

**【請求項17】**

鋳型核酸の配列を決定する方法であって、前記方法は、

(i) 標的体積中の複合体であって、鋳型核酸、プライマー、および重合酵素を含む複合体を、1つ以上の異なるタイプの発光標識ヌクレオチドにさらすことであって、各タイプの発光標識ヌクレオチドは、請求項1～16のいずれか一項に記載の標識ヌクレオチドを含む、前記さらすことと、

(ii) 1つ以上の励起エネルギーの一連のパルスを前記標的体積の近くに向けることと、

(iii) プライマーを含む核酸への連続的な取り込み中に、発光標識ヌクレオチドから複数の放射光子を検出することと、

(iv) タイミングと、任意選択的に放射された光子の発光強度とを決定することにより取り込まれたヌクレオチドの配列を識別することと、

を含む、方法。

**【請求項18】**

鋳型核酸を配列決定するためのキットであって、前記キットは、

2つ以上の異なるタイプの発光標識ヌクレオチドを含み、各タイプの発光標識ヌクレオチドは、請求項1～16のいずれか一項に記載の標識ヌクレオチドを含む、キット。

**【請求項19】**

反応混合物中に2つ以上の異なるタイプの発光標識ヌクレオチドを含む核酸配列決定反応組成物であって、各タイプの発光標識ヌクレオチドが請求項1～16のいずれか一項に記載の標識ヌクレオチドを含む、核酸配列決定反応組成物。